云 南 植 物 研 究 1994; 16 (4): 385—391
Acta Botanica Yunnanica

杜仲皮中抗真菌蛋白的分离和特性研究 *

刘小烛 胡 忠 李 英 杨俊波 李炳钧
(中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204)

摘要 从杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv)皮中分离纯化到一种新的抗真菌蛋白(Eucommia Antifungal Protein)，简称 EAFP。将切碎的杜仲树皮用 NaCl 溶液在组织捣碎器中高速匀浆提取，经硫酸铵沉淀、CM-cellulose 离子交换层析和 Bio-gel-p-10 凝胶层析纯化。如此纯化而得的 EAFP 在 SDS-PAGE 胶片上显示一条分子量为 5.0 kD 的单一带。反相 HPLC 显示样品是纯的。等电聚焦电泳测得其 pI 值大于 11.0。经还原和氨酰羧甲基化处理，用 HPLC 层析证明 EAFP 为单链。用酚-硫酸法未测出其含糖。EAFP 是简单单链蛋白。氨基酸组成分析结果表明它富含 Arg、Cys 和 Gly，不含 Met, Lys, Trp, His 和 Phe。未经热变性或 SDS 处理的 EAFP 与考马氏亮蓝试剂不发生显色反应。手工 Edman 降解法测得 N-端 3 个氨基酸残基的顺序为 Gly-Asp-Ala。用羧肽酶 A 和 B 酶解 EAFP 测得其 C-末端为 Val。 0.3 mg / mL 蛋白明显抑制木霉、小麦赤霉菌、烟草黑茎病菌和棉花枯萎病菌菌丝的生长。蛋白在沸水中保温 30 min 活性不变。

关键词 杜仲, 抗真菌蛋白

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIFUNGAL PROTEIN FROM THE BARK OF EUCOMMIA ULMOIDES

LIU Xiao-Zhu, HU Zhong, LI Ying, YANG Jun-Buo, LI Bing-Jun
(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences,* Kunming 650204)

Abstract A new antifugal protein named EAFP was isolated with 0.5 mol / L NaCl from the bark pieces of *Eucommia ulmoides* Oliv and purified by ammonium sulfate fractionation, carboxymethylcellulose ion-exchange chromatography and Bio-gel-p-10 gel filtration. Purified EAFP thus abtained gave a single band having a molecular weight of 5 kD on SDS / PAGE. An elution pattern of the sample in reverse phase HPLC indicated that the sample was pure. EAFP is a single polypeptide and pI 〉 11.0 determined by reduction and S-carboxamidomethylation and eletrofocusing on Ampholine / polyacrylamide-gel plates. There is not carbohydrate in EAFP detected by phenol-sulfate reaction. Analysis of the composition of amino acids showed that EAFP is rich in Arg, Cys and Gly, but lacks Met, Lys, Trp,His and Phe. EAFP can not give colour reaction with Coomassie blue reagent except that the protein is denatured by heat or SDS treatment. Manual Edman degradation showed that sequence of EAFP from N-terminus was Gly-Asp-Ala- and the digestion with carboxypeptidase A and B showed that C-terminal

* 国家 863 计划资助项目
1993-11-25 收稿, 1994-01-20 修回

residue of EAFP was Val. EAFP at 0.3 mg / mL inhibited obviously the growth of Trichoderma viride Pers.: Fr. mycelia and some crop fungal pathogens. The antifungal activety of EAFP was unchanged by incubation at boiling temperature.

Key words *Eucommia ulmoides,* Antifungal protein

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 系杜仲科植物，树皮是传统的中药材。我们从杜仲树皮中分离到一种能抑制真菌生长的蛋白，称为杜仲抗真菌蛋白 (Eucommia Antifungal Protein，简称 EAFP)。EAFP 与其他抗真菌蛋白[1—4]比较，有以下特点: ①分子量小；②是不含糖的单链蛋白；③抗菌谱宽；④具有很高的热稳定性。从等电点高、分子量小和不含 Trp 这几点看，EAFP 与 Thionin 有相似之处[5]；从 N 端顺序、C 末端和 Thionin 富含 Lys 而 EAFP 不含 Lys 等方面比较，EAFP 又和 Thionin 不同。由此看来，在多种多样的植物中存在着多种多样的抗真菌蛋白。寻找和研究多种类型的抗真菌蛋白，对认识其在植物中抗真菌病的作用和将其基因用于作物抗真菌病的研究均有意义。本文报告杜仲皮中抗真菌蛋白的分离和特性研究结果。

材料和方法

1. 材料

供提取蛋白质的材料是新鲜的杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv)树皮，在 4℃ 存放待用。PITC, TFA 和 N-甲基吗啉为日本 TCI 产品；二硫苏糖醇、羧肽酶 A 和 B 为德国 Boehringer 产品；碘乙酰胺是瑞士 Fluka 产品；三乙胺和标准氨基酸使用 Waters 产品。其余试剂为分析纯。

2. 蛋白质的提取和纯化

将杜仲皮洗净，切成小碎片，置于组织捣碎器中，加入 1-2 倍重量、在 4℃ 预冷过的 NaCl 溶液(0.5 mol / L pH 6.0)高速匀浆提取 10 min，纱布过滤，滤液于 $10^4 \times g$ 冷冻离心 20 min, 上清液边搅拌边加入硫酸铵达 95%饱和度。置于 4℃ 10 h，$10^4 \times g$ 冷冻离心，取沉淀溶解于蒸馏水，在 4℃ 对蒸馏水透析除去硫酸铵。$10^4 \times g$ 冷冻离心，取上清液用 CM-cellulose-52(20mm × 13 cm)柱层析分离(图 1)，在 Tris-HCl 缓冲液 pH 8.9 中加入 NaCl，用 NaCl 0-0.75mol / L 线性梯度洗脱。流出液用紫外检测器在 277 nm 监测。如此分离到的蛋白再经 Bio-gel-p-10(14 mm × 90 cm)柱层析纯化(图略)得到纯蛋白。洗脱液为 0.01 mol / L pH 6.5 的磷酸缓冲液，检测波长为 277 nm 。流出的蛋白液用 Ymicon YM-5 超滤膜超滤脱盐浓缩，冰冻干燥得到 EAFP 样品。288 g 树皮纯化得到 29 mg EAFP 样品。

3. 反相高效液相色谱层析

EAFP 的纯度鉴定、氨酰羧甲基化 EAFP (Cm-EAFP)的制备和 PTH-氨基酸的鉴定都在岛津 LC-3A 高效液相色谱仪 Zorbax-ODS(4.6 mm I.D × 2.5 cm)层析柱上进行。层析 EAFP 和 Cm-EAFP 时，洗脱液为含有 0.05% 三氟乙酸(TFA)的乙腈水溶液，用线性梯度 20% - 80% 的乙腈洗脱，流速 0.8 ml / min，检测波长 275 nm[图 2 和图 7]。PTH-氨基酸的鉴定用 pH 4.5 0.01 mol / l NaAc 缓冲液 / 甲醇 (1 : 1 V / V)溶液洗脱，柱温 40℃，流速 0.8 ml / min，检测波 269 nm[14] (图略)。

4. 抗真菌活性测定

在 PDA 培养基上接种真菌，黑暗中 28℃ 培养，待菌丝长至培养皿面积的 2 / 3 时，在菌丝前沿直接滴加样品液，再培养，以肉眼能观察到菌丝生长被抑制的蛋白最低浓度为抗菌指标[1—3]。

5. 理化性质测定

氨基酸组成分析按常规盐酸水解法，用日立 835-50 型氨基酸分析仪分析。EAFP 的荧光发射光谱(图 6)表明其不含色氨酸[9]。

EAFP 氨酰羧甲基化按[8]的方法进行。反应液上 HPLC 分离 S-氨酰羧甲基化 EAFP (Cm-EAFP)(图 7)。

N-端顺序的测定用手工 Edman 降解法进行。PTH-氨基酸用 HPLC 反相层析来鉴定。C-端顺序采取羧肽酶 A 和羧肽酶 B 混合的方法[13]进行。具体步骤采用[14]方法。取样时间为: 5 min, 15 min, 30 min, 1 h 和 2 h。酶解释放出来的氨基酸采用[8]的方法来分析。将氨基酸转化为苯异硫氰酸衍生物(PTC-氨基酸)。PTC-氨基酸在 Waters 990 HPLC 上，用层析柱 PICO.TAG™Column(3.9 mm × 15 cm)，按 PICO.TAG™ 方法进行。流动相 A B 二相作梯度(曲线 5)洗脱。A 相: 139 mmol / l NaAc, 6% 乙腈，0.05% TEA，pH 6.4；B 相: 60% 乙腈。12 min B 相由 0 到 46%，流速为 1 ml / min，检测波长为 254 nm。

SDS-PAGE 为 15% 胶，Laemmli 缓冲系统[7,12]。低分子量标准为 Pharmacia 产品。等电聚焦电泳采用 Disc 法，管径 0.5 cm，管长 13.5 cm，聚丙烯酰胺胶浓度 5%，使用 pH 9-11 的 Ampholine (LKB)，200 V 恒压电泳至电流接近于零，并且不再下降为止[10,11]。

用酚-硫酸比色法检测 EAFP 的糖含量[15]。

结果和讨论

1. EAFP 的分离、纯化和活性测定

杜仲树皮用 0.5 moL / L NaCl 提取、经硫酸铵沉淀、用 CM-cellulose-52 柱层析分离到图 1 中的 D 组分具有抗真菌活性。再经 Bio-gel-p-10 柱层析纯化后得到纯的 EAFP，以它作为 EAFP 样品。

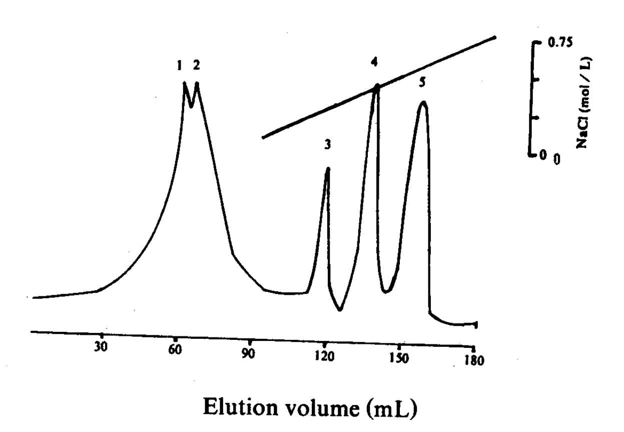


图 1　蛋白在羧甲基纤维素 CM-52 柱 (20 mm × 13 cm) 上的层析分离洗脱曲线。上柱样品为经 95% 饱和度硫酸铵沉淀、用蒸馏水溶解后的样品。收集活性组分 5。

Fig. 1 Protein elution profile on a carboxy-methylcellulose CM-52 column(20mm × 13cm). The precipitate from 95% ammonium sulfate saturation was dissolved in water, and the solution abtained was applied to the column.The active fraction 5 was pooled.

鉴定 EAFP 的纯度使用了聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS-PAGE 和反相高效液相色谱层析等方法。在聚丙烯酰胺凝胶电泳胶片上显示单一带(图略)，在 SDS-PAGE 胶片上显示一条分子量为 5.0 kD 的单一带(图 3)，在反相 HPLC 图谱上为单一峰(图 2)。

0.3 mg / mL EAFP 对绿色木霉和小麦赤霉菌的生长有明显的抑制作用(图 4)。EAFP 在沸水中保温 0.5 h，抑菌活性不变(图 4 A-4)。

2. EAFP 的特性

SDS-PAGE 的结果表明 EAFP 的分子量仅 5.0 kD。酚-硫酸比色法测定 EAFP 不含糖。EAFP 经还原和氨酰羧甲基化处理、在反相 HPLC 图谱上为单一峰(图 7)，证明 EAFP 为单链蛋白。由于 EAFP 在用 CM-cellulose 分离时，在 pH 8.9 的缓冲液中都要较高浓度的 NaCl (0.5 mol / L)才能被洗脱，说明其 pI 值较高；在 pH 9—11 的 Ampholine 系统中作等电聚焦电泳，EAFP 泳动出了 pH 11 的边缘，说明 EAFP 的 pI 值大于 11。以上说明 EAFP 为分子量较小的简单单链碱性蛋白。

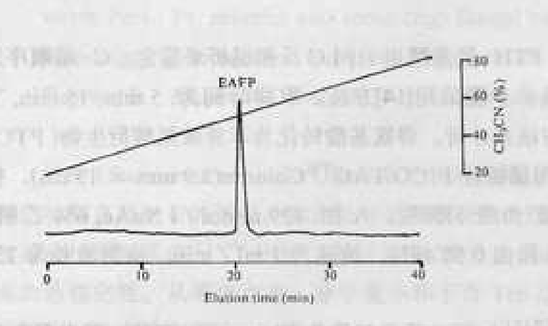


图 2 EAFP 的 HPLC 反相层析曲线。层析柱 Zorbax-ODS(4.6 mm x 25 cm)

Fig. 2 Elution profile of EAFP in reverse-phase HPLC. HPLC was carried out on a Zorbax-ODS(4.6 mm x 25 cm).

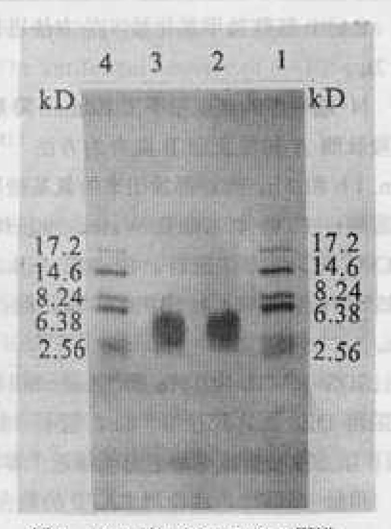


图 3 EAFP 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE pattern of EAFP. 1、4: MW markers, 2、3, EAFP.

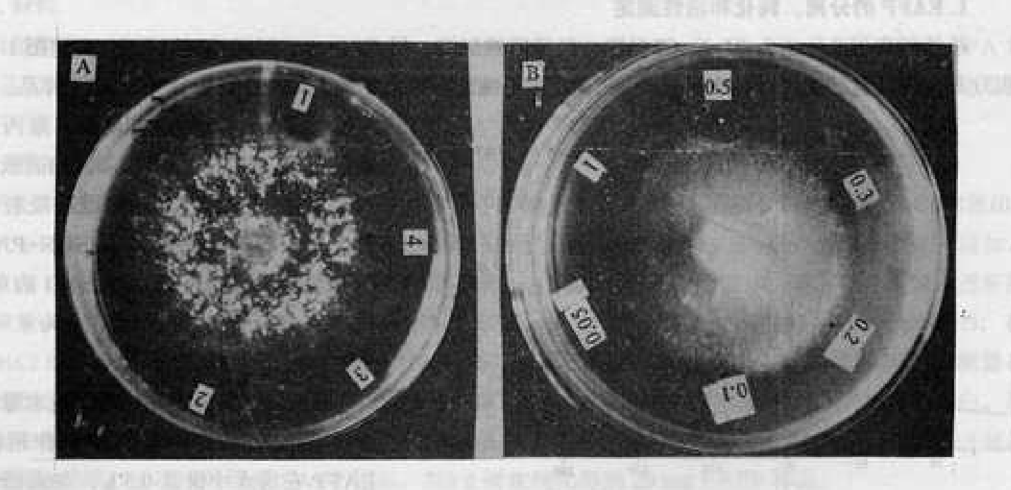


图 4 EAFP 对绿色木霉和小麦赤霉菌菌丝生长的抑制。A: 绿色木霉。B: 小麦赤霉菌

Fig. 4 Inhibition of mycelial growth of *Trichoderma viride* and *Gibberella saubinetii* by EAFP (5μL). A: *Trichoderma viride*; B: *Gibberella saubinetii*. 1. 1 mg / mL; 2. 0.5 mg / mL; 3. 0.3 mg / mL; 4. 1 mg / mL of EAFP was incubated by 0.5 h at boiling temperature.

EAFP 的荧光发射光谱峰在 306 nm(图 6)，表示其含有 Tyr 而不含 Trp[9]。EAFP 的紫外吸收峰在 275 nm(图 5)，E=8.73。以 Tyr 的 $=1.1\times10^3$、EAFP 的分子量为 5.0 kD、其中含有 3 个 Tyr，用 A=CL 公式计算的结果 E 为 6.6，和测定值接近。

EAFP 氨基酸组成分析的结果如表 1，它富含 Gly、Cys 和 Arg，不含 Lys、Trp、Met、His 和 Phe。Thionin 富含 Lys，两端残基都是 Lys[5]，EAFP 在这一点上是与 Thionin 不同的。用手工 Edman 降解法测得的 N-端 3 个残基的顺序为 Gly-Asp-Ala。用羧肽酶 A 和 B 酶解 EAFP 测得其 C-

末端为 Val(图 8)。未经变性处理的 EAFP 与考马氏亮蓝试剂不发生显色反应，这和 GAFP[1] 相同。

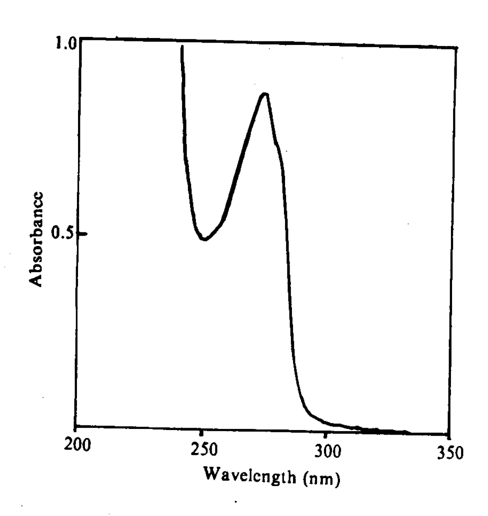


图 5 EAFP 的紫外光谱

Fig. 5 UV spectrum of EAFP. E of its aqueous solution at pH 7 is 8.73.

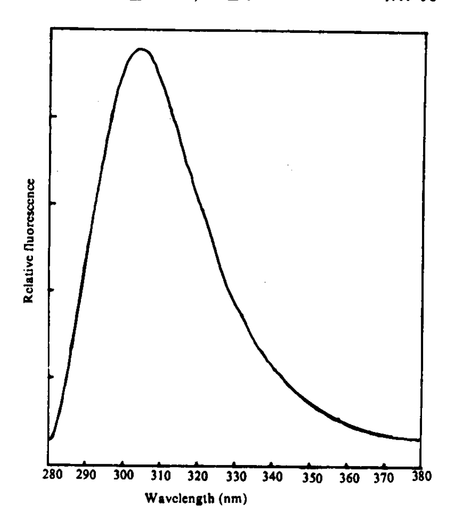


图 6. EAFP 的荧光发射光谱荧光激发光波长 280 nm

Fig. 6 Fluorescence emission spectra of EAFP. The exciting ligth wavelength of fluorescence was 280 nm.

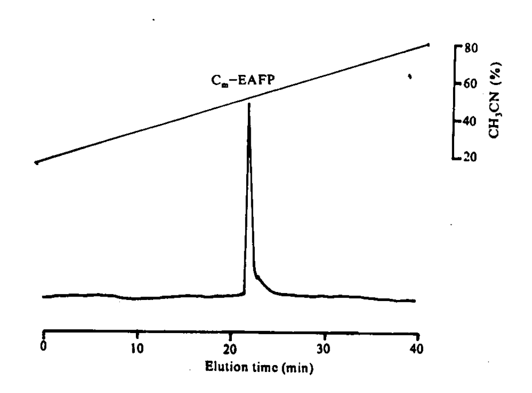


图 7 EAFP 经氨酰羧甲基化处理后的溶液的 HPLC 反相层析曲线。层析柱 Zorbax-ODS(4.6 mm × 25 cm)

Fig. 7 Elution profile of Cm-EAFP was S-carboxamidomethylated subjected to reverse-phase HPLC. HPLC was carried out on a Zorbax-ODS(4.6 mm × 25 cm).

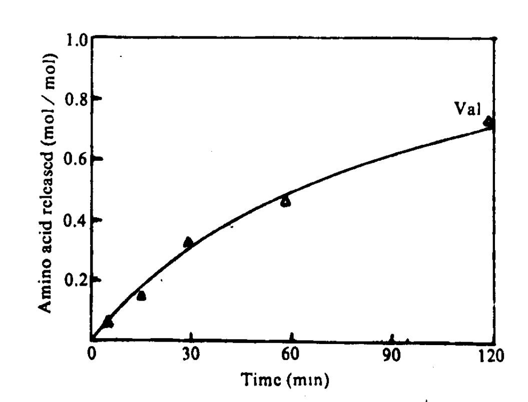


图 8 用羧肽酶 A 酶解 EAFP 由 C-末端释放出来的氨基酸

Fig. 8 Amino acids released from the C-terminus of the EAFP after digestion with carboxypeptidase A.

EAFP 作为一个新发现的抗真菌蛋白，具有分子量小、不含糖、单链和热稳定的特点。本文还报道了其氨基酸组成、N-端顺序和 C-末端。EAFP 的发现和本文报道的数据可能对将来抗真菌蛋白在抗真菌作用中的机理、抗真菌蛋白的结构与功能以及抗真菌蛋白的基因工程的研究产生意义。

表1 杜仲抗真菌蛋白的氨基酸组成分析

Table 1 The amino acid composition of EAFP

Amino acid	Analysis data of protein sample n mol	n gram	%	Calculated data mol / 100mol	mol / mol of Protein
Asp	3.192	424.59	6.79	8.30	3.12 (3)
Thr	0.826	98.30	1.57	2.13	0.81 (1)
Ser	3.332	350.16	5.60	8.67	3.26 (3)
Glu	2.342	344.27	5.51	6.09	2.29 (2)
Pro	2.835	326.06	5.22	7.38	2.77 (3)
Gly	7.096	532.26	8.51	18.49	6.94 (7)
Ala	4.210	375.08	6.00	10.95	4.12 (4)
Cys	3.870	468.73	7.49	10.07	3.78 (4)
Val	1.013	118.52	1.89	2.64	0.99 (1)
Met	0.101	15.12	0.24	0.26	0.10 (0)
Ile	1.023	134.10	2.14	2.66	1.00 (1)
Leu	1.064	169.61	2.24	2.77	1.04 (1)
Tyr	2.856	517.27	8.27	7.43	2.79 (3)
Phe	0.222	36.72	0.59	0.58	0.22 (0)
Lys	0.221	32.29	0.51	0.58	0.22 (0)
Arg	4.036	703.85	11.26	10.50	3.97 (4)
NH	4.039	68.67	–	–	–
Total	38.439	4620.51	73.93	100	37

1) Protein sample was 6250 n gram.

2) Calculated on a basis of one residue of Ile.

参 考 文 献

〔1〕胡忠, 杨增明, 王钧. 天麻球茎中一种抗真菌蛋白的分离和部分特性. 云南植物研究, 1988, **10:** 373—383.

〔2〕陶应双, 胡忠. 商陆根中抗真菌蛋白的分离和特性研究. 云南植物研究, 1991, **13:** 417—424.

〔3〕杜良成, 李英. 棕榈花序中抗真菌蛋白的分离及特性. 植物生理学报, 1993, **19:** 167—171.

〔4〕Roberts W K, Selitrennikoff C P. Isolation and partial characterzationof two antifungal proteins from barley. *Biochem Biophycs Acta,* 1086, **880:** 161—170.

〔5〕Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, *et al.* Leaf specific thionins of barley a novel class of cell wall proteins toxic to plant--pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO J,* 1988, **7:** 1559—1565.

〔6〕Hu Z, Liu X Z, Huang Q Z *et al.* Isolation, characterization and amino acid sequencing of an antifungal protein from the seeds of *Phytolacca americana.* In Du Y C (ed) Peptides: Proceedings of the Chinese Peptide Symposium 1990. Beijing: Science Press, 1991, 3—7.

〔7〕Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteria phage T4. *Nature,* 1970, **227:** 680—685.

〔8〕刘小烛, 胡忠等. 马槟榔甜味蛋白 I 的氨基酸全顺序测定. 见: 中国科学技术协会首届青年学术年会论文集: 理科分册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 394—399.

〔9〕Morton R A. Biochemical Spectroscopy: Adam Hilger, London. 1975, 1: 178—219.

〔10〕刘培楠等编. 仪器分析及其在分子生物学中的应用, 第三册. 北京: 科学出版社, 1978.

〔11〕郭尧君. 薄层等电聚焦. 生物物理学报, 1988, 4(4): 389—391.
〔12〕张龙翔等编. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981, 112—119.
〔13〕徐秀璋编著. 蛋白质顺序分析技术. 北京: 科学出版社, 1988, 107—108.
〔14〕刘小烛, 胡忠. 马槟榔甜味蛋白 N- 和 C- 末端部分氨基酸顺序的测定. 云南植物研究, 1988, 10: 381—388.
〔15〕王克夷. 糖蛋白中糖含量的测定. 鲁子贤主编. 蛋白质和酶学研究方法, 第三册. 北京: 科学出版社, 1989; 37—39.